

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	福 井 啓 太
論文題目	Studies on Microbial Succinate Production (微生物を用いたコハク酸生産に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>地球温暖化が危惧され、石油資源を再生可能資源で代替することが模索されるなか、植物資源に由来するプラスチック原料としてコハク酸が注目を集めており、様々な微生物を用いたコハク酸発酵に関する研究が行われている。発酵生産の効率化には、細胞内にて生成した目的化合物を細胞外に排出する排出輸送体が重要であることが知られているが、コハク酸の排出輸送体は報告されていなかった。本論文は、コハク酸生産菌<i>Corynebacterium glutamicum</i>、<i>Escherichia coli</i>、<i>Enterobacter aerogenes</i>におけるコハク酸排出輸送体の同定と解析を行い、これら排出輸送体のコハク酸発酵への影響を明示したものである。</p> <p>第一章では、グラム陽性細菌<i>C. glutamicum</i>におけるコハク酸排出遺伝子<i>sucE1</i>を同定した。<i>C. glutamicum</i>のコハク酸生産株では、コハク酸の生産が嫌気条件にて効率化される。一方、菌体の生育は好気条件で良好なため、好気条件で培養した菌体を用いて嫌気条件でコハク酸生産を行うためには、コハク酸生産の前に微好気条件でコハク酸生産系を誘導する必要がある。微好気条件でコハク酸排出遺伝子が誘導されていると予想し、トランスクリプトーム解析により好気条件に対して微好気条件で発現量が上昇している膜タンパク質遺伝子を抽出した。続いて、抽出された10遺伝子について増幅、欠損によるコハク酸生産への影響を調べた。その結果、欠損により嫌気条件でのコハク酸生産能が消失し、増幅によりコハク酸生産が約1.5倍向上する<i>sucE1</i>遺伝子を見いだした。本遺伝子は、好気条件と比較して微好気条件での発現量が約3倍上昇した。SucE1の推定アミノ酸配列を用いて解析を行い、アスパラギン酸：アラニン交換輸送体 (AAE) ファミリーに属することを示した。また本遺伝子欠損株を対象としたメタボローム解析の結果、欠損によって菌体内コハク酸とフルクトース-1,6-ビスリン酸濃度がそれぞれ約1.7倍に上昇していたことから、<i>sucE1</i>遺伝子の欠損によってコハク酸排出が律速となり、蓄積したコハク酸が菌体内の代謝に影響を及ぼしていると推定した。更に、部分精製したSucE1を保持する再構成膜を用いてコハク酸輸送試験 (counterflow実験) を行い、SucE1がコハク酸トランスポーターであることを明らかにした。</p> <p>第二章では、グラム陰性細菌である<i>E. coli</i>におけるコハク酸排出遺伝子<i>yjjPB</i>を同定し、<i>Enterobacter aerogenes</i>由来のホモログがジカルボン酸排出遺伝子であることを示した。<i>E. coli</i>由来<i>yjjPB</i>の同定には、耐酸性グラム陰性細菌<i>Pantoea ananatis</i>が低pH条件でコハク酸感受性になることを利用したスクリーニング系を用いた。本菌に<i>E. coli</i>由来ショットガンライブラリーを導入して耐性株を選抜し、耐性株が保持していたプラスミドの解析より、新規コハク酸排出遺伝子<i>yjjPB</i>を取得した。<i>E. coli</i>コハク酸生産菌において、本遺伝子を欠損すると嫌気条件でのコハク酸生産能力が約30%に低下した</p>			

ことから、*yjjPB*がコハク酸生産に重要であることを明らかにした。また、*C. glutamicum ΔsucE1*株を用いた相補実験において、*YjjPB*がコハク酸の輸送体であり*yjjP*と*yjjB*の両方の遺伝子が必要であることを示した。スレオニン排出やセリン排出輸送体が属しているThrEファミリーには、2つの保存領域、ThrEとThrE_2が知られているが、*YjjP*はThrEドメインを*YjjB*はThrE_2ドメインを保持していることを見だし、*YjjPB*は進化の過程においてThrEファミリーのタンパク質が2つの遺伝子に分裂して生じた可能性を示した。一方、*E. coli*同様グラム陰性のコハク酸生産菌である*E. aerogenes*、*Mannheimia succiniciproducens*、*Actinobacillus succinogenes*も*YjjPB*ホモログを有し、いずれも高い相同性を有していることを示した。そこで、特に高い相同性を有していた*E. aerogenes*が保有するホモログEa*YjjPB*の解析を行った。本遺伝子を増幅すると、好気条件、嫌気条件におけるコハク酸生産能力が向上し、リンゴ酸やフマル酸といった他のジカルボン酸中間体の副生量が増加した。また欠損すると、嫌気条件でのコハク酸生産能力が75%に減少した。*C. glutamicum ΔsucE1*株を用いた相補実験から、Ea*YjjPB*がコハク酸などのジカルボン酸の輸送体であり、その機能発現にEa*YjjP*とEa*YjjB*の両方が必要であることを見だし、グラム陰性細菌とグラム陽性細菌に異なるコハク酸排出システムが存在していることを示した。

第三章では、*P. ananatis*由来ジカルボン酸排出遺伝子*ynfM*の*C. glutamicum*におけるホモログである*CgynfM*の解析を行った。*C. glutamicum*はコハク酸デヒドロゲナーゼを欠損すると好気条件でコハク酸を生産するようになるが、著量の酢酸やピルビン酸を副生することが課題であった。本遺伝子を増幅することによってコハク酸の生産量が顕著に向上し、ピルビン酸や酢酸の副生が消失した。また、 α -ケトグルタル酸生産量が顕著に増加し、コハク酸と α -ケトグルタル酸の共発酵に成功した。*C. glutamicum ΔsucE1*株を用いた相補実験により、*CgYnfM*がジカルボン酸の輸送体であることを示した。本相補実験において、*SucE1*やEa*YjjPB*による相補と比較して、コハク酸の生産量が低く、コハク酸以外のジカルボン酸（フマル酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸）の生産量が増加していたことから、*CgYnfM*がジカルボン酸に対する広い基質親和性を有していることを見いだした。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

資源循環型社会の構築に向け、再生可能資源の活用が進められるなか、植物資源に由来するプラスチック原料であるコハク酸の生産技術向上が求められており、様々な微生物を用いたコハク酸生産に関する研究が展開されている。一方、発酵生産において排出輸送体は生産能の向上に重要であることが知られているにも関わらず、コハク酸排出輸送体に関する報告は無かった。本論文は、様々な微生物におけるコハク酸排出輸送体を特定し、コハク酸生産への応用を試みたものである。評価すべき点として以下の4点があげられる。

1. グラム陽性細菌 *Corynebacterium glutamicum* 由来コハク酸排出輸送体 SucE1 を同定し、コハク酸生産への有用性を示した。また、排出輸送体の機能解析に取り組み、精製タンパク質を用いた *in vitro* 解析により SucE1 がコハク酸トランスポーターであることを見いだした。
2. グラム陰性細菌 *Escherichia coli* 由来コハク酸排出輸送体 YjjPB を同定し、コハク酸生産への有用性を示した。更に、排出輸送体欠損株における物質生産能の相補を指標とした排出輸送体の簡易評価系を確立した。
3. グラム陰性細菌 *Enterobacter aerogenes* 由来ジカルボン酸排出輸送体 EaYjjPB を同定し、コハク酸生産への有用性を明らかにした。更に、グラム陰性細菌とグラム陽性細菌が異なるコハク酸排出システムを有することを示した。
4. *Corynebacterium glutamicum* 由来ジカルボン酸排出輸送体 CgYnfM を同定し、コハク酸生産への有用性を明らかにするとともに、 α -ケトグルタル酸発酵への応用の道を開いた。

以上のように、本論文は、微生物のコハク酸排出輸送体を同定し、その機能を明らかにするとともに、コハク酸生産の効率化に資する産業上の有用性を示したものであり、発酵生理学、制御発酵学、分子微生物科学、応用生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）